OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

83

V. SAGGESE

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA FLORA MICOLOGICA INTESTINALE DEI BAMBINI

ESTRATTO DAL *Giornale di Batteriologia e Immunologia*
Vol. XI - N. 6 (Dicembre 1933 - XII)

IMPERIAL MYCOLOGICAL
4 MAY 1934
INSTITUTE

Clinica Pediatrica della R. Università di Pisa
Direttore: Prof. G. FIORE
Laboratorio di Batteriologia del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
Direttore: Prof. R. PEROTTI

Dott. V. SAGGESE, *Assistente vol. della Clinica Pediatrica*

Contributo allo studio della flora micologica intestinale nei bambini [1])

Lo studio dei miceti è andato assumendo sempre maggiore importanza da quando le indagini e i dati sperimentali hanno concordemente permesso di identificare in alcuni di essi gli agenti etiologici di particolari forme morbose. Così la flora micologica è passata da uno studio di interesse puramente botanico del vasto campo della parassitologia umana e animale. E infatti, se pochi sono veri parassiti, molti dei miceti, nonostante la loro diffusione ubiquitaria, possono per determinate circostanze diventare patogeni.

Le intensificate e perfezionate ricerche, indirizzate appunto allo scopo di rilevare possibili rapporti tra fenomeni morbosi ed elementi fungini, hanno spinto i ricercatori a studiare la flora micromicetica dovunque gli organi sono o possono venire più o meno a diretto contatto con l'ambiente. Però se numerosi sono ormai i dati circa la flora della cute, della bocca e delle vie aeree, scarsi sono quelli delle vie digestive. Tuttavia per quanto riguarda le ricerche sulla flora micologica del canale intestinale esistono importanti osservazioni. Il Castellani riscontrò nelle feci di adulti alcune Candida (C. tropicalis, C. rotundata. C. asteroides) e alcune Monilia (M. foecalis, M. insolita, M. intestinalis). Harter isolò dalle feci di un enteritico una Monilia che prese il suo nome. Scalas trovò nelle feci di 50 adulti, ammalati di svariate malattie, prevalentemente delle vie respiratorie e delle vie digestive, 17 volte l'Oidium albicans, per lo

[1]) Il presente studio fu oggetto di comunicazione alla seduta dell'11 giugno 1933-XI della Sezione Toscana di Pediatria, tenutasi a Pistoia.

più nelle ultime, due volte l'Aspergillus fumigatus e una volta i due insieme. Altre segnalazioni al riguardo sono quelle di Mattlet che isolò il Blastodendrion intestinale dalle feci di un dissenterico, di Ashford e Ciferri che descrissero la Torulopsis nitritophila, di Ciferri che rinvenne una varietà di Eutorulopsis dubia (v. portoricensis). Talice rinvenne nelle feci di un bambino morto di cachessia la Mycotorula n. sp., e varie Mycotoruloides in bambini con mughetto buccale o enteritici e in un adulto affetto da sprue. Uno studio recente di Graziano, nelle feci di lattanti sani ed ammalati, rivelò la presenza di specie fungine generalmente ubiquitarie, quali alcuni Penicillium, Aspergillus, Macrosporium, Cladosporium, ed altre già segnalate presenti nell'organismo umano, quali Candida insolita e C. krusei. E ancora più recentemente, Hirano, esaminando molti bambini ammalati della Clinica Pediatrica di Tokio, ha riscontrato nel 72 % dei casi reperto positivo per il fungo del mughetto (?), mentre solo il 34 % presentava le caratteristiche lesioni buccali.

Le mie ricerche, riguardanti l'esame di 50 campioni di feci, sono state indirizzate allo scopo di mettere in evidenza la flora micetica che può rinvenirsi nel canale intestinale dei bambini di varia età, sani ed ammalati. In quest'ultimo caso ho avuto cura di ripetere l'esame più volte in periodo di malattia e a guarigione avvenuta. Gli esami micologici furono praticati per la maggior parte in bambini della Clinica Pediatrica e per il resto nel Brefotrofio.

Le feci furono prelevate direttamente dal retto dei bambini a mezzo di tubi di vetro o di cateteri Nelaton previamente bolliti e dopo una accurata pulizia con acqua bollita della regione anale. Il materiale fu stemperato in acqua sterile e con aliquote dello stemperamento così ottenuto furono allestite scatole Petri alla gelatina e agli agar Sabouraud, Raulin, e infuso di fagiuoli. Ad eccezione della gelatina, fu coltivato a 37°.

Per la diagnosi dei funghi a micelio mi sono attenuto ai testi classici e per lo studio dei blastomiceti asporigeni ho seguito le norme dettate da Ciferri e Redaelli, non senza tener conto per la sistematica degli emendamenti ultimamente apportati da Langeron e Talice e da Verona, e in ciò guidato dal Prof. Verona del Laboratorio di Biologia vegetale del R. Istituto Sup. Agrario di Pisa, che vivamente ringrazio.

Num. di individui esaminati	N. d'ord. degli esami	Giorno d'esame	Nome e Cognome	Età	Particolarità dell' allattamento	Stato di salute	Reazione fecale	Reperto micologico
I	1	4-10-'32	M. M.	mesi 8	all. art.	gastroetenerite acuta	acida	Rhizopus nigricans Penicillium crustaceum
	2	15-11-'32				(guarigione)	»	negativo
II	3	6-10-'32	T. M.	anni 3		enterite	acida	Geotrichum sp.
III	4	14-10-'32	F. C.	anni 6		dissenteria bacillare	acida	negativo
IV	5	14-10-'32	D. G.	mesi 10	all. art.	enterocolite dissenterif.	acida	Fusarium vasinfectum
	6	1-11-'32				»	»	» »
	7	12-11-'32				»	»	» »
								Aspergillus varians
								Mycotorula sp. (2)
	8	2-12-'32				distrofia	»	Mycotorula sp. (6)
	9	20-12-'32				»	»	Mycotorula sp. (7)
	10	2- 1-'33				in via di guarigione		negativo
V	11	20-10-'32	C. R.	anni 3		enterite	acida	Aspergillus niger
	12	14-11-'32				(guarigione)	»	negativo
VI	13	20-10-'32	A. S.	mesi 18		dispepsia	acida	negativo
	14	14-11-'32					»	»
	15	23-11-'32				(guarigione)	»	»
VII	16	25-10-'32	A. M.	giorni 4	all. art.	sano	neutra	negativo
	17	1-11-'32				mughetto	alcalina	Mycotorula sp. (1)
	18	12-11-'32			all. misto	(guarigione)	acida	Mycotorula sp. (3)
	19	26-11-'32					»	Mycotorula sp. (5)
	20	20-12-'32					»	Mycotorula sp. (8)
	21	13- 2-'33					»	negativo
VIII	22	20-11-'32	A. S.	mesi 6	all. mat.	sano	acida	negativo
IX	23	20-11-'32	P. A.	mesi 18		enterite	acida	Geotrichum sp.
X	24	23-11-'32	L. L.	mesi 5	all. mat.	sano	acida	negativo
XI	25	23-11-'32	G. B.	mesi 5	all. mat.	dispepsia	acida	Mycotorula sp. (4)
XII	26	23-11-'32	A. I.	mesi 3	all. mat.	sano	acida	negativo

Num. di individui esaminati	N. d'ord. degli esami	Giorno d'esame	Nome e Cognome	Età	Particolarità dell' allattamento	Stato di salute	Reazione fecale	Reperto micologico
XIII	27	23-11-'32	S. V.	mesi 18	all. mat.	sano	acida	negativo
XIV	28	26-11-'32	D. G.	anni 2		distrofia	alcalina	negativo
XV	29	26-11-'32	M. O.	anni 2½		dissenteria bacillare	acida	negativo
XVI	30	20-12-'32	G. M.	mesi 6	all. mat.	sano	acida	Penicillium crustaceum
	31	1-2-'33				»	»	negativo
XVII	32	15-1-'33	V. O.	giorni 10	all. mat.	dispepsia	acida	Mycotorula sp. (9)
XVIII	33	18-1-'33	N. A.	mesi 6	all. mat.	sano	acida	negativo
XIX	34	15-1-'33	P. L.	anni 3½		sano	acida	negativo
XX	35	24-2-'33	O. C.	mesi 11	all. mat	sano	acida	Penicillium crustaceum
	36	15-3-'33				»	»	negativo
XXI	37	25-2-'33	R. L.	anni 5		sano	acida	Aspergillus sp.
XXII	38	25-2-'33	O. R.	anni 5		sano	acida	negativo
XXIII	39	25-2-'33	D. G.	mesi 3½	all. mat.	sano	acida	negativo
XXIV	40	25-2-'33	V. A.	anni 2		sano	acida	Penicillium sp.
XXV	41	30-2-'33	G. A.	anni 2½		sano	alcalina	negativo
XXVI	42	20-3-'33	C. M.	anni 3		enterite da Lamblia	alcalina	negativo
XXVII	43	20-3-'33	M. F.	mesi 18		dispepsia	acida	negativo
XXVIII	44	21-3-'33	B. S.	anni 4		sano	acida	negativo
XXIX	45	25-3-'33	G. M.	giorni 40	all. mat.	sano	acida	negativo
XXX	46	25-3-'33	C. P.	giorni 21	all. mat.	sano	acida	negativo
XXXI	47	2-4-'33	G. R.	anni 4		sano	acida	negativo
XXXII	48	2-4-'33	P. M.	mesi 3	all. mat.	sano	acida	negativo
XXXIII	49	2-4-'33	C. M.	mesi 5	all. mat.	sano	acida	Penicillium sp.
XXXIV	50	8-4-'33	G. G.	giorni 28	all. mat.	mughetto, dispepsia, eritema cutaneo	acida	Mycotorula sp. (10)

Come risulta dalla precedente esposizione le specie isolate sono riferibili in parte a funghi, a miceli conidioidei (Penicillium, Aspergillus, Fusarium) o artrosporei (Geotrichum), e in parte a funghi gemmanti o blastosporei (Mycotorula).

Per quello che si riferisce ai primi, poco è da rilevare per quanto riguarda le loro caratteristiche e il loro riferimento sistematico, se si eccettuano pochi ceppi di Penicillium e Aspergillus, determinati solo genericamente, e il ceppo di Fusarium che richiamò la mia attenzione per la sua costante presenza in numerosi esami eseguiti sullo stesso soggetto. Questo fungo, sugli agar, sviluppa lentamente una scarsa vegetazione biancastra costituita da ife cilindracee, ialine, variamente ramose, settate, con conidi generalmente clavati o fusoidei, continui o septati di μ 3,2 - 3,5 $\times$ 9,6 - 12,8. Dall'esame di questi ed altri caratteri colturali e morfologici esso appare identico — come ha confermato il Prof. Wollenweber, noto studioso di Fusarium, al quale ho spedito un campione della coltura — al Fusarium vasinfectum Atkinson f. I. Wr. (= Fus. vasinfectum v. inodoratum Wr.), parassita delle piante di cotone e di alcuni frutti.

Per quanto si riferisce ai Geotrichum, non specificatamente determinati, essi hanno dato luogo sugli agar Sabouraud, Raulin, fagiuoli e peptone ad una rigogliosa vegetazione bianca, delicata, aderente al substrato e di aspetto quasi farinoso in superficie. Lo stesso si verificò su patata e su carota. Nei brodi, specialmente glucosati e saccarati, si formò in superficie una densa membrana resistente. Nel latte sviluppò bene acidificando e coagulando la caseina. All'aspetto microscopico la vegetazione di questi funghi si dimostrò costituita di corti filamenti miceliari originanti artrospore ialine, rettangolari, con plasma omogeneo o granuloso: dimensioni medie μ 2,4 - 3,3 $\times$ 4,9 - 6,6. Formazione anche di oidi, grandi μ 4,6 - 5,8 $\times$ 8,2 - 9,9, subrotondi, ovali od ellitici, germinanti per lungo tubo promicelico. L'insieme di tali caratteri, e sopratutto la formazione prevalente di artrospore, fanno rientrare questi ceppi, come ho detto, nel genere Geotrichum.

Per quello che si riferisce ai blastomiceti ho su questi fatto cadere in modo particolare la mia attenzione per alcune ragioni che dirò in seguito, e ne ho condotto lo studio sistematico al fine di stabilire sopratutto le loro particolari attitudini fisiologiche.

Mycotorula sp. (1). — Cellule subrotonde od ovali con contenuto omogeneo o finemente granuloso, provviste di vacuolo e grossa goccia oleosa. Misurano μ 4,9 - 5,8; sono presenti grosse « cellule giganti » di dimensioni notevolmente maggiori, μ 9,6 $\times$ 12; sono presenti ammassi sferoidali di blastospore in corrispondenza dei setti di corti filamenti micelici. Non forma ascospore. Ottimo di temperatura 35° - 38°. In agar-Sabouraud sviluppa rapidamente formando colonie bianche, rotonde, opache, leggermente rilevate, poltacee, finemente granulose, ad orlo frangiato per presenza di formazioni micotoruloidi. Patina estesa con uguali caratteri negli strisci. Con uguali caratteri si presenta anche in agar-Raulin, agar-fagiuoli, agar-peptone. In agar-Gorodkowa sviluppo più limitato: non formazione di ascospore. Patina come negli strisci su patata e carota. Nel latte si sviluppa coagulando. In gelatina nutritiva e in coltura per infissione si ha sviluppo superficiale, limitato invece lungo il fittone: non fluidificazione. In brodo pepto-glucosato sviluppa bene, mantenendo il liquido scorrevole che si intorbida leggermente: non velo in superficie, deposito leggero al fondo. Colonie giganti si sviluppano in gelatina nutritiva e negli agar, bianche, un po' appiattite, subrotonde, ad orlo omogeneo, leggermente sinuose. Assimila glucosio, levulosio, maltosio, saccarosio, lattosio, galattosio, raffinosio, glicerina, mannite: delle sostanze azotate assimila l'asparagina, i peptoni, non i nitrati e non l'azoto ammoniacale. Inverte il saccarosio, fermenta il glucosio, il maltosio, il lattosio, più lentamente il levulosio; non fermenta il raffinosio e il galattosio.

Per quanto si riferisce al riferimento sistematico, per il non formarsi spore, la specie rientra nei blastomiceti asporigeni e più esattamente nella famiglia delle Torulopsidaceae Cif., sottofam. Mycotoruleae Cif. et Red. La presenza poi di blastospore tipicamente raggruppate in ammassi sferoidali in prossimità dei setti micelici fa rientrare il ceppo nel genere Mycotorula (Will.) Cif. et Red.. e, meglio, nel sottogenere Eu-Mycotorula Ver. Rimarrebbe ora a vedersi la determinazione specifica; ma questa, per mancanza di ceppi di confronto, non è stata per il momento eseguita.

Mycotorula sp. (2). — Cellule subrotonde od ovoidi, con contenuto di solito granuloso, con grosso vacuolo e goccia oleosa.

Misura in media μ 4,7 × 5,7. Non forma ascospore. Seguito nel suo sviluppo, questo ceppo si dimostra quanto mai pleomorfo. Si osservano infatti ora dei semplici ammassi gemmanti, ora invece blastospore disposte in corrispondenza dei setti micelici, ora infine queste ultime formazioni con blastospore disposte in catenelle. Ottimo di temperatura 30° - 35°. In agar-Sabouraud sviluppa rigogliosamente formando colonie bianche, rotonde o subrotonde, opache, appena rilevate, poltacee, finemente granulose, con orlo più o meno frangiato. Patina estesa con analoghi caratteri negli strisci. Con uguali caratteri si presenta in agar-Raulin, in agar-fagiuoli, agar-peptone. In agar-Gorodkowa sviluppo più lento di patina meno estesa che negli altri agar. Non formazione di ascospore. Patina analoga agli strisci su carota e patata. Nel latte sviluppa coagulando. In gelatina nutritiva e in coltura per infissione si ha sviluppo superficiale, limitato lungo il fittone; fluidificazione assente. In brodo pepto-glucosato sviluppa intorbidando leggermente il liquido; non si ha formazione di coperta e solo leggero deposito al fondo. Colonie giganti in gelatina nutritiva e negli agar, grandi, bianche, non molto rilevate, umide, liscie, subrotonde, con orlo sinuoso. Assimila glucosio, levulosio, maltosio, saccarosio, lattosio, galattosio, raffinosio, glicerina, mannite; assimila bene l'azoto amidico e dei peptoni, non dei nitrati e dei sali ammonici. Inverte saccarosio, fermenta glucosio, maltosio, lattosio; più lentamente levulosio e galattosio.

Per quanto concerne il suo riferimento sistematico, richiamandomi a quanto ho detto circa lo sviluppo, durante il quale presenta formazioni tipo Blastodendrion, Mycotorula, Mycotoruloides, aventi punti di contatto con Mycotorula e con Candida, non si può non convenire del suo pleomorfismo che lascia dubbi sul suo riferimento generico. Ma attenendomi ai criteri della maggior parte degli AA., per i quali è il carattere di prevalenza che deve essere sopratutto valutato, ascrivo la specie al genere Mycotorula. Non sono poche del resto le specie che presentano spiccato carattere di pleomorfismo: lo stesso Redaelli descrisse un ceppo assai vicino a Candida krusei, e presentante forme di Enantiothamnus e Mycotorula, e forme prevalenti di Candida.

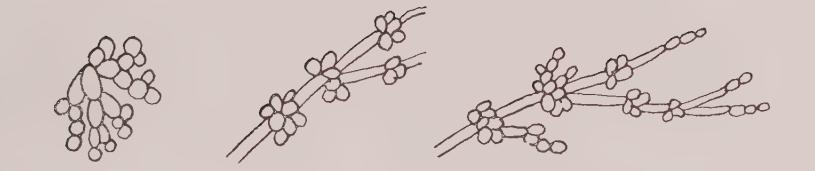
Mycotorula sp. (3). — Questo stipite presenta caratteri morfologici, colturali e biochimici del tutto identici a quelli descritti

per la Mycotorula sp. (1), salvo trascurabili differenze nel comportamento colturale, e tali da non apparire giustificato il sopravalutarle.

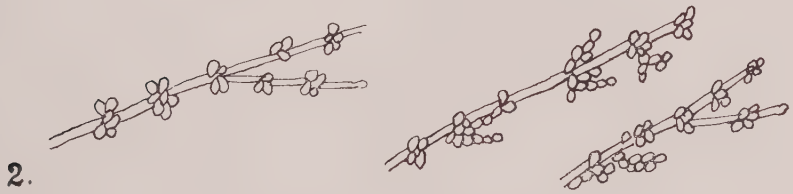
Mycotorula sp. (4). — Cellule ellittiche o subrotonde di μ 4,9 - 6,6 $\times$ 6,6 - 8,2 dal contenuto protoplasmatico raramente omogeneo, di solito invece granuloso, ricco di piccole gocce, o una o due grandi gocce di grasso: membrana evidente, liscia. Sono presenti corti filamenti micelici, ai quali sono unite e addossate, in corrispondenza dei setti, numerose blastospore: tali ammassi sono ora regolari e sferoidali, come vengono tipicamente figurati per Mycotorula, ora invece confusamente ammassati con verticilli secondari di blastospore, in parte leggermente catenulate come in Mycotoruloides. Non forma ascospore. Ottimo di temperatura 32° - 36°. In agar-Sabouraud sviluppa rigogliosamente con caratteri analoghi agli altri ceppi: solita patina negli strisci e colonie in coltura a piatto bianche, circolari, granulose, poltacee, ad orlo frangiato. Così negli altri agar: Raulin, fagiuoli, peptone. In agar-Gorodkowa identico, ma più limitato sviluppo. Non vi forma ascospore. Lo stesso sviluppo, su patata e carota: in quest'ultima sviluppo rigoglioso. Nel latte sviluppa coagulando. In gelatina nutritiva e in coltura per infissione si ha sviluppo in superficie assai esteso, limitato lungo il fittone; non fluidificazione. In brodo pepto-glucosato sviluppa rigogliosamente intorbidando molto il liquido che rimane scorrevole; tenui frammenti di velo in superficie, denso deposito fioccoso al fondo. Colonie giganti su gelatina nutritiva e su agar non dissimili da quelle descritte per gli altri stipiti. Assimila glucosio, levulosio, maltosio, saccarosio, lattosio, galattosio, raffinosio, glicerina, mannite; assimila l'azoto amidico, della asparagina e delle sostanze proteiche, non dei nitrati nè dei sali ammonici. Inverte saccarosio; fermenta glucosio, raffinosio, maltosio, lattosio, levulosio, galattosio.

Per quanto riguarda il suo riferimento sistematico, rientra per i suoi caratteri morfologici nel genere Mycotorula, sottogenere Mycotoruloides, ed appare vicina per i caratteri biochimici a quella indicata come Mycotorula sp. (2).

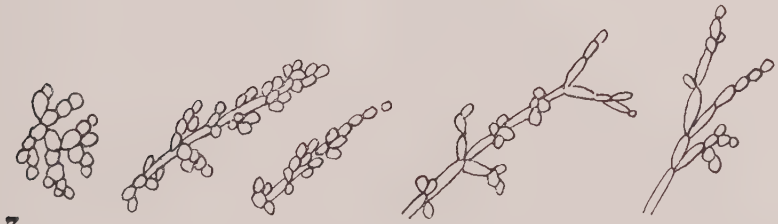
Mycotorula sp. (5). — Cellule ellittiche di μ 5,2-6,8 $\times$ 6,8-8,2 con vacuoli e gocce di grasso. Filamenti micelici brevi, non frequenti, con blastospore in ammassi irregolari, talvolta catenu-



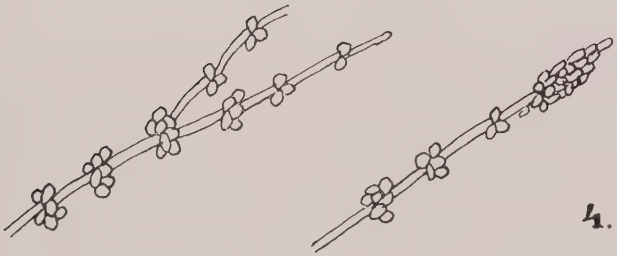
1.



2.



3.



4.

1 - Mycotorula sp. (2)
2 - Mycotorula sp. (4)
3 - Mycotorula sp. (5)
4 - Mycotorula sp. (7)

late. Presenta formazioni diverse, delle quali è difficile dire quale predomina poichè i reperti non si mantengono costanti in relazione alla diversità dei substrati colturali e all'età delle colture. Siamo di fronte a una di quelle forme già riscontrate, notevolmente pleomorfe. Non forma ascospore. Ottimo di temperatura intorno ai 30°. In agar-Sabouraud e negli altri sviluppa rigogliosamente con caratteri uguali a quelli degli altri ceppi. In agar-Gorodkowa lo sviluppo è più limitato e non forma ascospore. Sviluppa bene su patata e carota. Nel latte sviluppa coagulando. In gelatina nutritiva sviluppo esteso in superficie, poco lungo il fittone. Non si ha traccia di fluidificazione neanche dopo un mese e più di coltura. In brodo pepto-glucosato si determina in seguito all'accrescimento un leggero intorbidamento, senza velo in superficie, con scarso deposito al fondo. Colonie giganti sui soliti substrati, come per gli altri ceppi. Assimila glucosio, levulosio, maltosio, saccarosio, lattosio, galattosio, raffinosio; non bene la glicerina; meglio la mannite; assimila scarsamente l'asparagina, bene i peptoni, pochissimo i nitrati, affatto i sali ammonici. Inverte saccarosio, fermenta levulosio, raffinosio, lattosio; non fermenta glucosio, maltosio, galattosio.

Il suo riferimento sistematico appare piuttosto difficile per l'eccessivo pleomorfismo: sembra ad ogni modo non avvicinarsi ad alcuno dei tipi descritti sopratutto per i caratteri biochimici, fra i quali l'attività fermentativa.

Mycotorula sp. (6). — I caratteri morfologici di questo ceppo richiamano quelli descritti per la Mycotorula sp. (2). Presenta formazioni tipiche di Mycotorula prevalentemente, con rare formazioni tipo Candida. I caratteri colturali si equivalgono anche con la Mycotorula sp. (2). Lo stesso è il comportamento dell'assimilazione delle diverse sostanze. Diversa invece appare l'attitudine fermentativa. Infatti inverte saccarosio e fermenta glucosio, levulosio, maltosio, lattosio; non galattosio, non raffinosio.

Circa il riferimento sistematico, tenendo conto dei caratteri di prevalenza, si ascrive al genere Mycotorula, e, poichè fu isolata nello stesso soggetto in cui fu rinvenuta la Mycotorula sp. (2), non si può escludere che sia una varietà fisiologica di essa, collimando quasi i caratteri morfologici e colturali.

Mycotorula sp. (7). — La specie in parola è stata isolata

come la Mycotorula sp. (2) e la Mycotorula sp. (6) dallo stesso soggetto dopo un certo tempo. I caratteri morfologici sono tipici di quelli attribuiti alla Mycotorula. Trattasi di blastospore, di forma sub-ellittica, riunite in ammassi sferoidali nei punti corrispondenti ai setti di corti filamenti micelici. I caratteri colturali ripetono quelli propri delle altre forme. Assimila i medesimi composti ternari e azotati, tra i quali però non i nitrati. Inverte il saccarosio; fermenta tutti gli zuccheri, meno il galattosio.

Per il suo riferimento sistematico risulta evidente la sua appartenenza al genere Mycotorula (Eu-Mycotorula).

Mycotorula sp. (8). — I caratteri morfologici e colturali appaiono identici a quelli della precedente e della prima forma descritta. Eguale comportamento dimostrò di fronte alle prove di assimilazione. A eguali risultati sortirono le prove fermentative.

Sistematicamente rientra dunque nel genere Mycotorula (Eu-Mycotorula), e dal complesso dei suoi caratteri può identificarsi colla specie descritta come Mycotorula sp. (1).

Mycotorula sp. (9). — Per i caratteri generali — morfologici e colturali — non abbiamo che a richiamarci a quelli descritti per le forme 1 e 8, non differendone affatto. Lo stesso per quanto si riferisce alle diverse prove di assimilazione; mentre l'attività fermentativa si dimostrò notevole, riuscendo a fermentare tutti gli zuccheri ricordati per le altre specie. Rientra tipicamente in Mycotorula pure apparendo, fisiologicamente considerata, un po' diversa dalle altre.

Mycotorula sp. (10). — Questa specie è identica in ogni suo carattere a Mycotorula sp. (1) colla quale si identifica (vedremo a suo tempo anche la identità fisiopatologica).

Delle 10 specie di Mycotorula isolate abbiamo, dunque, che alcune di esse si presentano identificabili in una sola specie.

Distinguiamo:

Mycotorula sp. 1

= Mycotorula sp. 3
= Mycotorula sp. 8
= Mycotorula sp. 10

Mycotorula sp. 7
Mycotorula sp. 9
Mycotorula sp. 4 (Mycotoruloides)
Mycotorula sp. 2 } specie pleomorfe
Mycotorula sp. 5 }
Mycotorula sp. 6 }

Trattasi quindi, in definitiva, di 7 specie diverse che provvisoriamente indicherò con le seguenti lettere:

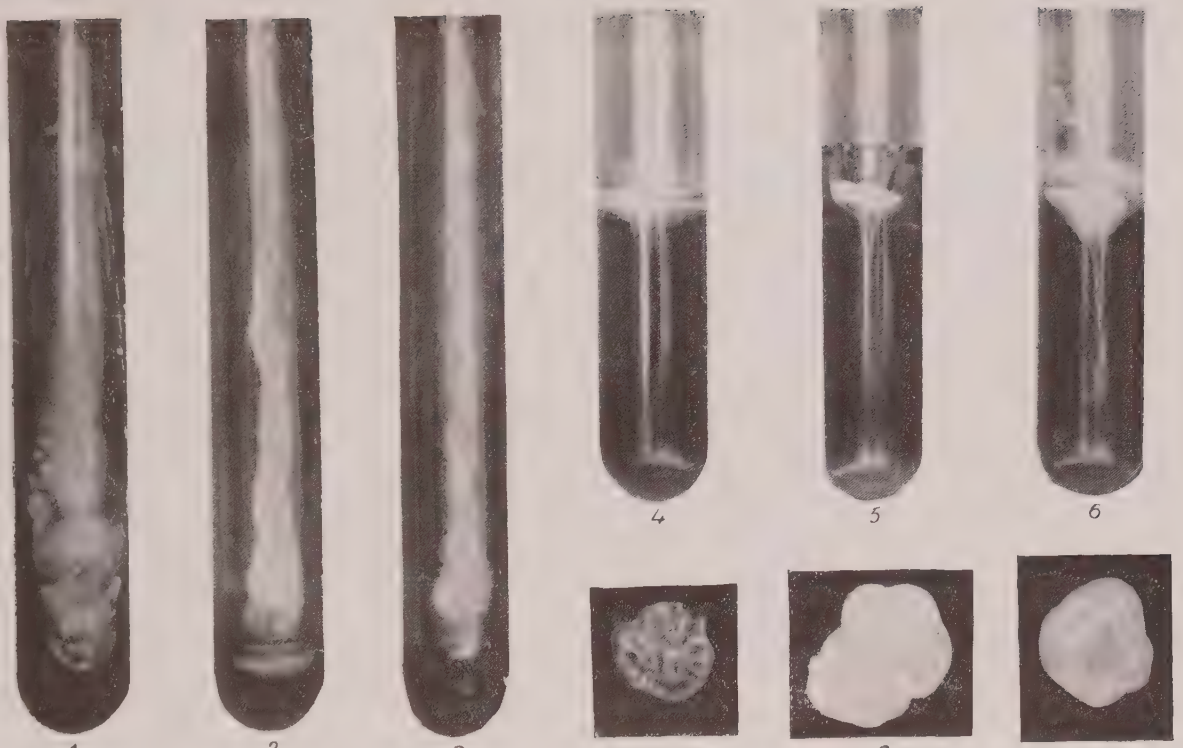
Mycotorula A (= Mycotorula 1, 3, 8, 10)
Mycotorula B (= Mycotorula 7)
Mycotorula C (= Mycotorula 9)
Mycotorula D (= Mycotorula 4)
Mycotorula E (= Mycotorula 2)
Mycotorula F (= Mycotorula 5)
Mycotorula G (= Mycotorula 6)

* * *

Nella disamina critica dell'importanza che si può attribuire alla flora fungina, alcune caratteristiche biologiche dei miceti, e specie di alcuni di essi che figurano anche nei miei reperti, meritano particolare considerazione. Tra le attitudini biologiche di alcuni funghi (blastomiceti blastosporei e artrosporei, ad esempio Mycotorula, Geotrichum) sono sopratutto interessanti alcune proprietà enzimatiche dovute alla presenza di enzimi saccarolitici e proteolitici, i quali, naturalmente, influiscono notevolmente modificando la composizione chimica dei substrati sui quali i miceti vivono, come non altrimenti modificano la concentrazione idrogenionica dei mezzi colturali.

Queste proprietà biologiche dei miceti sono legate alle attitudini fondamentali della loro vita stessa. La loro nutrizione infatti avviene sostanzialmente a mezzo di azioni enzimatiche capaci di preparare l'alimento necessario dall'ambiente a spese delle proteine e dei loro prodotti di degradazione fino agli aminoacidi, degli idrati di carbonio, dall'amido ai prodotti della sua depolimerizzazione, delle sostanze grasse e dei sali.

A integrare la biologia cellulare fungina interviene l'altra gamma del metabolismo, cioè la disassimilazione, di cui la parte



Geotrichum: striscio su agar fig. 1
infissione in gelatina fig. 4
colonia gigante fig. 7

Mycotorula A: striscio su agar fig. 2
infissione in gelatina fig. 5
colonia gigante fig. 8

Mycotorula C: striscio su agar fig. 3
infissione in gelatina fig. 6
colonia gigante fig. 9

Tavola II

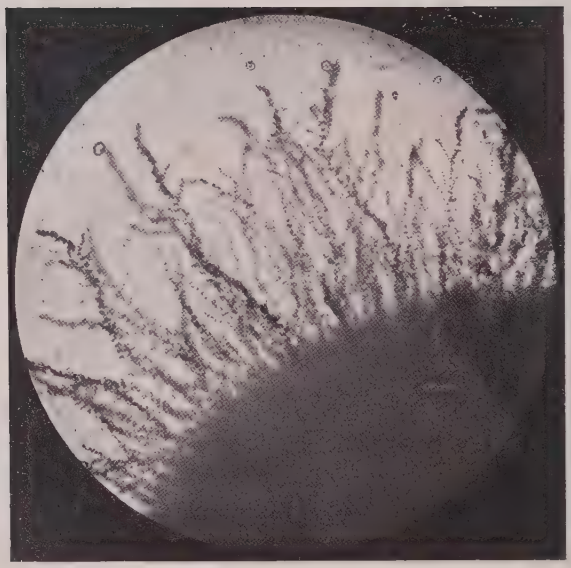


Fig. 1. — Bordo di colonia di Mycotorula A.

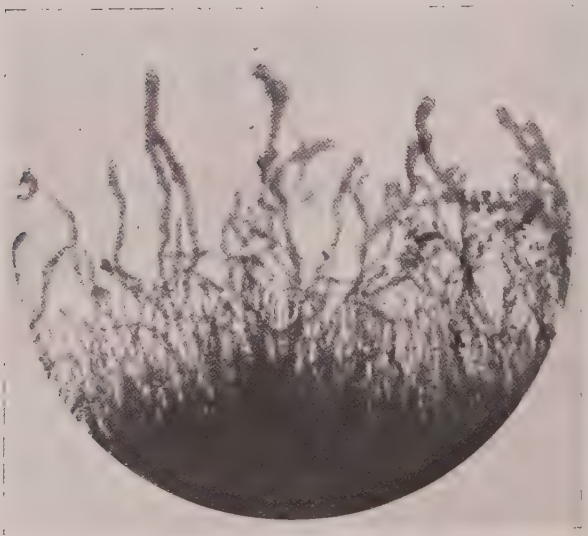


Fig. 2. — Bordo di colonia di Mycotorula D.

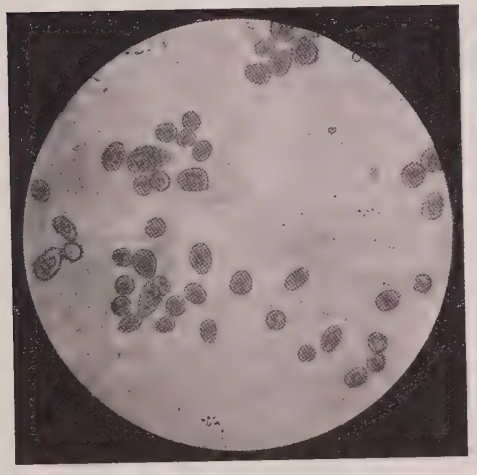


Fig. 3. — Microfotografia di oidi di Geotrichum sp.

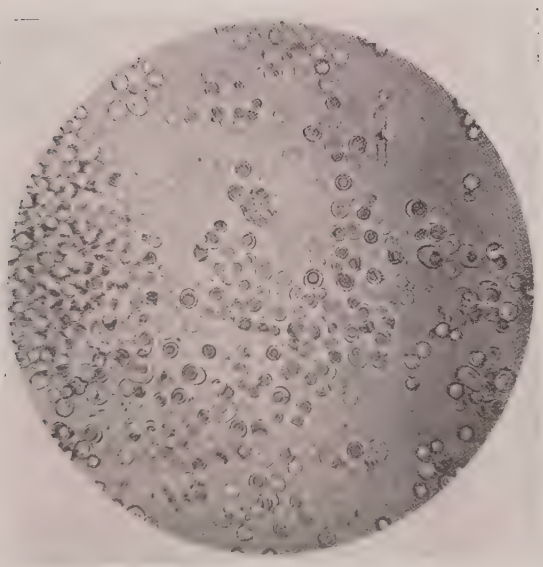


Fig. 4. — Microfotografia di blastospore di Mycotorula A.

più importante è la produzione, spesso minima e trascurabile ma talvolta spiccata, di tossine: attività da cui risultano dimostrabili speciali fenomeni, non ben conosciuti nella loro intima essenza di allergia e di immunità che si producono negli organismi colpiti.

Però determinate condizioni fisico-chimiche ambientali ed altre che a noi sfuggono possono modificare ed esaltare queste attività degli elementi fungini, e talvolta influire su tutta la complessa biologia cellulare fino a cambiarla profondamente. Infatti alcuni caratteristici fenomeni conseguenti, che i micologi chiamano polimorfismo e pleomorfismo, e che nella patologia degli schizomiceti trovano corrispondenze analoghe, ci dicono quale importanza si deve attribuire a questa eventualità. E' così che spesso un esatto valore delle attitudini morfo-biologiche di un fungo può sottrarsi a un rilievo sicuro. Così, per esempio, condizioni anormali fisico-chimiche intestinali possono esaltare alcune attività di un fungo ospite, come a noi sarà difficile rilevare nella giusta misura, allorchè quelle stesse condizioni non abbiamo potuto nè possiamo realizzare. Questi fatti, senza che siano eccessivamente sopravalutati, possono illuminarci sull'eventualità di fenomeni disfunzionali e morbosi.

Tra le condizioni ambientali modificatrici delle attività biologiche dei miceti le più conosciute sono le associazioni microbiche. Queste associazioni possono mantenersi in limiti di relativa innocuità, tali nel così detto commensalismo, come possono per gradi intermedi arrivare al vero e proprio parassitismo. Così l'Endomyces albicans può, secondo Stoecklin, esaltare la virulenza di alcuni germi fra cui quello difterico. Spronck e Nobécourt dimostrarono che il bacillo difterico, se inoculato insieme a un micete a tipo fermento, uccide la cavia a dosi nelle quali da solo è inattivo. Nell'infezione tubercolare, secondo Redaelli, grande importanza hanno nell'evoluzione morbosa del processo le associazioni di miceti. Chiurco sperimentalmente trovò che, inoculando insieme piogeni e ifomiceti in animali, si ottenevano quasi sempre lesioni gravi che talvolta conducevano a morte, mentre inoculando gli stessi germi separatamente non si ottenevano che leggere reazioni locali. E così il Castellani trovò che lo stesso colibacillo è stimolato da funghi a tipo fermento isolati dalle feci.

Da questi dati mí sembra che risulti chiara e sufficiente l'importanza dei miceti in associazione a schizomiceti nel possibile determinismo di alcuni fenomeni patologici, per cui ne deriva una considerazione patogenetica che va tenuta presente in eventuali sindromi morbose.

Infine, nella catena integrativa dei fattori che possono portare a una efficienza esuberante fino al patologico l'attività dei miceti, vanno considerati, e non ultimi, quali momenti predisponenti, condizioni di minorata riserva immunitaria o di aumentata recettività dell'organismo ospite. Così possiamo spiegarci il fatto per cui il fungo del mughetto (qualunque esso sia), pur vivendo saprofita nella cavità orale, può in alcune occasioni determinare il mughetto buccale, e in altre ancora forme faringo-laringee, e talvolta forme broncopolmonari.

Da queste premesse non ho intenzione di concludere che ogni micete riscontrabile nell'organismo rappresenti segno di malattia o poco meno; teoricamente però, dice giustamente il Redaelli, ogni micete è potenzialmente capace di divenire, per svariate ragioni, parassita. Ora, a parte tutto ciò che di incerto e di oscuro v'è intorno alla vita dei micromiceti, appare per lo meno alquanto chiaro che alcuni di essi quando non sono in una fase di vero e proprio parassitismo (dirò così per riguardo alle cosidette mutazioni), apportano nell'ambiente nel quale vivono, col contributo delle loro ordinarie attività funzionali, delle modificazioni biochimiche che possono in particolari casi avere un non trascurabile valore. Infatti, senza uscire dal campo pediatrico, se per spiegare fenomeni di indubbia importanza nella patogenesi di alcune sindromi morbose, come la reazione chimica intestinale, si dà tanta importanza a ipotetiche virulentazioni e a predominanza di certi germi che vivono abitualmente nell'intestino del bambino, perchè non attribuirne alcuna alla presenza, tanto più quando questa sia costante e invadente, dei micromiceti, che pure posseggono attive, e iperattive, se favoriti da particolari contingenze, proprietà enzimatiche capaci di influire sul chimismo intestinale? Noi sappiamo quanto labile sia la funzione gastro-intestinale del bambino, nel quale pure bastano cause insignificanti per turbarne l'euritmia, per non tener nel dovuto conto questa possibilità. E ciò senza parlare di vere e proprie micosi, nel qual caso l'elaborazione di tossine da parte

dei miceti diventa il primum movens di altro ordine di fenomeni.

Dopo queste considerazioni pregiudiziali ritengo opportuno fare una breve illustrazione delle mie ricerche.

Ho esaminato 50 campioni di feci in 34 bambini in parte sani ed in parte ammalati. Tra gli ammalati ho scelto prevalentemente quelli di forme gastro-intestinali, come quelli cioè in cui più degli altri sono modificate in un modo o nell'altro le condizioni ambientali per la vita dei miceti in genere. La presenza dei miceti si ebbe in 14 casi, ossia nel 41 %, percentuale che riferita agli individui sani e agli ammalati diventa rispettivamente del 29 % per i primi e del 60 % per i secondi. Tra gli individui sani vi è un gruppo di 10 lattanti al seno: in questi, tutti al disotto di 6 mesi, il reperto fu positivo 2 volte, ossia solo il 20 % dei casi; invece su 3 lattanti al seno malati il reperto fu positivo in tutti e tre, ossia nel 100 % dei casi. Ho avuto cura di guardare all'atto del prelevamento delle feci lo stato della reazione. In quasi tutti i casi essa era acida, in uno solo, essendo neutra a reperto negativo, divenne alcalina al primo reperto positivo, e poi acida all'epoca degli altri esami ripetuti e a reperti anche positivi. Questo dato concorda col fatto che i miceti in genere vivono preferibilmente in ambiente acido. In molti dei casi in cui fu praticato l'esame micologico, e specie nei lattanti, sia ad allattamento materno che artificiale, fu praticato contemporaneamente l'esame batterioscopico e l'esame chimico-microscopico dei residui fecali. Nei riguardi dell'esame batterioscopico non si è notato una grande alterazione dei reperti, nel senso di una selezione della flora batterica, nonostante che si notassero ampie oscillazioni, ma non costanti, della flora Gram-positiva e di quella Gram-negativa, e tra le forme bacillari e le forme cocciche. Nei riguardi dell'esame chimico-microscopico si è notato spesso desquamazione epiteliale intestinale; e nei riguardi della digestione si è notata quasi sempre alterata la proporzione dei residui fecali, la quale è risultata a vantaggio degli acidi grassi e dei saponi. In un caso (n. 16), in una bambina a cui vennero somministrate delle frazioni di amido e di destrine fin dal primo giorno di vita, in un'alimentazione complessiva fatta per tre quarti di latte in polvere e per un quarto di latte umano, la digestione dei carboidrati complessi era sufficientemente buona, anzi più che buona data l'età, per cui sono ten-

tato a pensare che tale digestione sia stata facilitata dai funghi che furono isolati dalle feci, i quali possedevano attive proprietà biochimiche e precisamente saccarolitiche. Ad ogni modo s'intende facilmente che sia gli spostamenti della flora batterica, che i disquilibri nei residui fecali, possono considerarsi conseguenza di azioni e turbe che non hanno nulla a che fare con la presenza dei miceti; ma sulla intensità dei processi avrà certamente influito la presenza di essi.

Ma, considerando i dati più sopra esposti, un primo fatto degno di rilievo è la presenza della flora micetica in una proporzione di gran lunga maggiore negli individui ammalati che nei sani. Anche senza voler sopravalutare il valore dei reperti, una conclusione ovvia è che la presenza dei miceti negli individui ammalati deve essere favorita, quando non ne sia la causa, da particolari fattori: siano le mutate condizioni fisico-chimiche preesistenti, sia una particolare composizione della flora microbica favorente la vita dei miceti, siano le diminuite condizioni immunitarie del soggetto ospite, o siano queste varie cause ingranate insieme, è cosa difficile a sceverare. Ma dall'insieme delle cose si può dedurre che, certamente, i miceti, specie quando la loro presenza è stata costante, hanno trovato nell'ambiente organico dell'individuo ammalato un mezzo adatto al loro metabolismo. Infatti riguardando alcuni reperti si rileva la presenza dei miceti durante il periodo di malattia, e se ne nota la scomparsa con il ripristinarsi dello stato di benessere. Dai reperti da me ottenuti non risulta invero una evidente e precisa elettività di forme; tuttavia, se alcuni ceppi fungini, es. ifomiceti: Penicillium, Aspergillus, ecc., si riscontrano tanto in individui completamente normali, come in ammalati, altri, invece, a tipo fermento, es. blastomiceti blastosporei e artrosporei: Mycotorula, Geotrichum, si riscontrano con più frequenza in individui con turbe intestinali. Gli ultimi, i blastomiceti asporigeni, e precisamente gli appartenenti ai generi Geotrichum e Mycotorula sono stati riscontrati nella notevole percentuale del 50 %. Le due specie di Geotrichum furono rinvenute tutte e due in individui ammalati. Delle 7 specie di Mycotorula, 6 furono rinvenute in individui ammalati e una in individuo sano. Le specie appartenenti al genere Mycotorula sono sopratutto importanti; e tra esse si rinvengono numerose forme patogene per l'orga-

nismo umano: valgano per tutti i casi di meningite finiti con la morte (Freeman). Le Mycotorule possono tuttavia trovarsi saprofiticamente nell'ambiente. Esse sono dotate, come si è visto, di particolari attività fermentative e assimilative. Perciò, per le speciali condizioni del loro rinvenimento, credo che possano, grazie alle loro attitudini biochimiche, aver, se non determinato, concorso a creare quegli stati di disfunzione intestinale che in alcuni casi raggiunsero espressioni di veri e propri stati morbosi. A proposito di Mycotorule da me isolate ritengo necessario sottolineare la possibilità che esse possano essere, come è stato dimostrato sufficientemente in due casi di cui parlerò in seguito, gli agenti etiologici di lesioni della mucosa orale, che clinicamente sono rappresentate dal mughetto.

Di tutti i casi di osservazione e di esame desidero un po' soffermarmi su tre che ritengo degni di considerazione.

Caso I. - N. 5 dell'elenco dei reperti. — Si tratta di un bambino di mesi 10, ricoverato in clinica per un'enterite dissenteriforme. Aveva avuto allattamento materno fino a 20 giorni dal suo ingresso in clinica, e la malattia era esordita tre giorni prima. Aveva quotidianamente numerose scariche liquide muco-sanguigne, qualche rara volta vomito, e lieve temperatura febbrile sui 37°,5. Vari esami batterioscopici furono negativi per la ricerca di forme parassitarie protozoarie; gli esami batteriologici e colturali per il bacillo dissenterico dettero anche esito negativo; l'esame colturale per i miceti praticato dalle feci due giorni dopo il ricovero nell'Istituto, dette esito positivo per la presenza di Fusarium vasinfectum Atk. Durante la degenza fu curato con siero antidissenterico (20 cc. al giorno per i primi 5 giorni) e medicazione sintomatica per la diarrea. Dopo pochi giorni scomparve la febbre (che in tutto il periodo di malattia raggiunse una sola volta fugacemente i 38°), l'alvo migliorò e diminuì il sangue nelle feci fino a scomparire verso il quindicesimo giorno. Complessivamente però le condizioni generali non ebbero un miglioramento. In seguito si alternarono periodi di miglioramento e di peggioramento e per ben tre mesi persistettero le turbe dell'apparato digerente con grandi ripercussioni sullo stato generale, ridotto scadentissimo e distrofico. Il peso corporeo, che all'ingresso in clinica era di Kg. 8,100, alla fine del primo mese di degenza era di Kg. 7,950, del secondo mese di Kg. 7,400, del terzo mese Kg. 7,650. L'alvo si mantenne sempre irregolare, le funzioni digestive sempre anormali. Verso la fine del terzo mese, le condizioni generali e quelle specifiche dell'apparato digerente incominciarono a migliorare definitivamente, sicchè fu poi dimesso completamente guarito. Dallo specchio dei reperti micologici, ottenuti in vari periodi, risulta la presenza di Fusarium vasinfectum nel periodo più grave della malattia fino a tutto il primo mese, e la presenza di Mycotorula sp. finchè durarono le condizioni morbose del bambino, ossia per poco più di un altro mese e mezzo. Non intendo affermare, poichè non ho le prove dimostrative, che in questo caso

la sindrome morbosa sia stata determinata dai miceti rinvenuti nelle feci. Però la presenza costante del primo fungo nel primo periodo, e la presenza nel secondo degli altri ceppi, delle cui spiccate attitudini biologiche ho già detto in precedenza, mi fanno pensare che non estranei siano stati i miceti nel determinismo del quadro clinico, in quanto avranno potuto, forse, produrlo, e ad ogni modo favorire ulteriormente con la loro presenza il persistere ed intensificarsi di processi chimico-biologici anormali e incompatibili con la regolare funzionalità dell'intestino.

Caso II. - N. 16 dell'elenco dei reperti. — Si tratta di una neonata ricoverata nella Clinica Pediatrica fin dal primo giorno di vita, non potendo la madre affetta da tubercolosi polmonare allattarla. In questo caso un esame micologico praticato al quarto giorno di vita dette esito negativo. All'età di giorni 14 la piccina presentò mughetto buccale e contemporaneamente fenomeni dispeptici gastro-intestinali. Un nuovo esame micologico subito praticato dalla patina buccale e contemporaneamente dalle feci dimostrò in tutte e due la presenza dello stesso germe, una Mycotorula sp. Logicamente la ragione della fugace turba delle funzioni intestinali sembra essere stata la repentina invasione dell'intestino da parte del micete che già esisteva nella parte più alta del canale digestivo. La bambina è poi guarita rapidamente, e, nonostante la presenza dello stesso elemento micetico e di altro dopo isolato, non ha presentato disturbi di sorta. Ho voluto sottolineare la facile dimostrazione di turbe intestinali, anche fugaci, in rapporto all'invasione, sicuramente determinabile, dell'intestino da parte di un fungo già esistente nell'organismo e che ha determinato una specifica lesione della mucosa orale.

Caso III. - N. 50 dell'elenco dei reperti. — Bambino di giorni 28, illegittimo, ad allattamento materno. Viene ricoverato in clinica prima di passare al locale Brefotrofio. Presenta residui di patina di mughetto, alvo dispeptico e arrossamento con disepitelizzazione delle regioni glutee e delle coscie e delle gambe, con evidente eruzione vescicolosa marginale. Si pratica, dopo una settimana dall'ingresso in clinica, contemporanea coltura dalla patina buccale, dalle feci e dalle vescicole della parte più distale degli arti inferiori, previa pulizia con acqua sterile. Il reperto dimostra in tutte e tre le colture la presenza dello stesso micete: Mycotorula sp. Il bambino è guarito spontaneamente del mughetto, con adatta cura della dermatomicosi gluteale e degli arti inferiori, ha avuto un regolare accrescimento, le condizioni generali sono state sempre buone, ma l'alvo si è evacuato quotidianamente 4 - 6 volte fino all'epoca della sua dimissione, avvenuta dopo un mese e mezzo di degenza. L'esame micologico non è stato però più praticato. In questo caso abbiamo dunque che lo stesso fungo che si è dimostrato patogeno per la mucosa orale, in quanto ha determinato il mughetto, e per la cute in quanto ha determinato una vera e propria micosi cutanea, è stato ritrovato nel canale intestinale, che appare così, con ogni probabilità, la via di trasmissione dalla prima alla seconda lesione. E, poichè questo fungo ha particolari attitudini fermentative, possiamo agevolmente ammettere che, nel passaggio dalla bocca all'intestino, avrà potuto in quest'ultimo determinare quei fenomeni dispeptici inizialmente osservati, e la persistenza di irritazione intestinale, causa delle frequenti evacuazioni giornaliere.

Da tutta la precedente esposizione un'osservazione sorge spontanea, ed è questa: come mai queste evenienze che teoricamente, data la diffusione dei funghi nell'ambiente, sembrerebbero così facili a verificarsi, nella pratica invece non si ritrovano? La ragione fondamentale per cui le alterazioni morbose, dell'intestino nel nostro caso, non si verificano così frequentemente, è che l'organismo umano è iper-resistente di fronte ai miceti in genere, e poi che, fra questi, i blastomiceti asporigeni sono anche fra i meno vitali. Non è escluso però che molte forme intestinali, non legate ad un agente etiologico definito, che spesso si incontrano nella pratica, e che si fanno dipendere da alterazioni fisico-chimiche ambientali, non meglio definite, non è escluso, ripeto, che in questi casi si tratti di forme morbose da miceti.

Sicchè, in conclusione dall'insieme delle mie ricerche e dalle considerazioni scaturite, ritengo che lo studio della flora micologica sia utile ed in qualche caso indispensabile. Nell'insieme dei germi che abitano il canale intestinale, specie nel bambino, non può essere ritenuta assolutamente indifferente la presenza dei micromiceti, che se nella maggior parte delle volte sono innocui (quand'anche per alcune loro attività biochimiche non riescono addirittura benefici), hanno potenzialmente la possibilità di nuocere, in maniera più o meno evidente, a seconda di particolari condizioni, di cui tra le più importanti sono la recettività organica e l'associazione microbica.

Riassunto. — L'A. ha praticato numerose ricerche allo scopo di mettere in evidenza la flora micologica intestinale nei bambini. Da tali ricerche risulta che i miceti possono riscontrarsi in bambini di qualsiasi età sani ed ammalati, ma si rinvengono con maggior frequenza negli individui ammalati. Rileva la particolare importanza di alcuni reperti ottenuti in bambini affetti da turbe dell'apparato digerente, e conclude affermando l'opportunità e l'utilità dello studio della flora micetica nella fisiopatologia dei processi chimico-microbici intestinali.

Résumé. — L'A. a fait de nombreuses recherches dans le but de mettre en evidence la flore micologique intestinale chez les enfants. Il résulte de ces recherches qu'on peut trouver les micetes chez des enfantes, de tout âge qu'ils soient, sains ou malades, mais on le trouve plus frequemment chez les sujets malades. L'A. note l'importance toute particulière de quelque resultats obtenus chez des enfants presentants de maladies de l'appareil digestif, et conclut en affirmant l'opportunité et utilité de l'étude de la flore micetique dans la physiopathologie des phénomènes chimico-microbiques intestinaux.

Summary. — The Author has made a long series of researches in order to bring into evidence the mycologic flora of the intestine of children. These researches show that mycetes may be found in children of any age, and either sick or in good health, but that they are met more frequently in sick children. The Author puts particular stress on certain observations made upon children suffering from sudden troubles of their digestive apparatus and concludes affirming the usefulness and advisability of studyings the mycetic flora in the physio-pathology of the chemico-microbial processes which take place in the intestine.

Zusammenfassung. — V. hat eingehende Untersuchungen über die mykologische Darmflora bei Kindern ausgestellt. Er könnte feststellen, dass Myzete in Darm von gesunden und kranken Kindern aller Altersstufen nachzuweisen sind. Auf Grund einiger interessanten Florabefunde in Kindern, die an Darmkrankheiten litten, weist V. auf die grosse Bedeutung der mycetischen Flora über die chemischen und mikrobischen Darmprozesse.

BIBLIOGRAFIA

Ashford e Ciferri R. « Zentr. f. Bakt., Parass. u. Infekt. », II Abt., Bd. LXXXI, 1930.

Brumpt: « Précis de Parassitologie », Paris, 1927.

Carnevale-Ricci: « Fermenti e pseudo-fermenti parassiti e commensali delle cripte tonsillari », Roma, 1926.

Ciferri R. « Zentr. f. Bakt., Parass. u. Infekt. », II Abt., Bd. LXXXIII, 1931.

De Potter F.: « C. R. de la Soc. de Biologie », p. 425, 1923.

Epstein B.: « Jahrbuch f. Kinderheilkunde F. E. », Bd. CIV, 1924.

Ferraris F.: Hiphales, in Flora Italica Cryptogama.

Graziano F.: « Rivista di Batt. e Immun. », 1930.

Hirano J.: rif. in « Bull. de l'Inst. Pasteur », 1932.

Langeron M. e Talice V.: « Ann. de Parassitol. humaine et comparée », 1931.

Lindau G.: Hyphomycetes, in « Die Pilze ».

Redaelli P.: « Rivista di Biologia, 1930 e 1931.

Redaelli P.: « Tecnica micologica medica », Bologna.

Redaelli P. e Ciferri R.: « Zentr. f. Bakt. u. Parass. u. Infekt. », II Abt., Bd. LXXVIII, 1929.

Scalas: « La Riforma Medica », 1923.

Saccardo P. A.: Sylloge.

Verona O.: « Nuovo Giorn. Botanico », 1933.

Wollenweber H. W.: « Zeitschr. f. Parasitenkunde », Bd. 3, H. 3, 1931.

Estratto dal *Giornale di Batteriologia e Immunologia*

Vol. XI - N. 6 (Dicembre 1933 - XII)